

09/601371  
JP93/00414  
01.02.98

日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

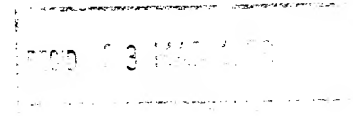
EU

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1998年 1月30日



出願番号  
Application Number:

平成10年特許願第032384号

出願人  
Applicant(s):

科学技術振興事業団

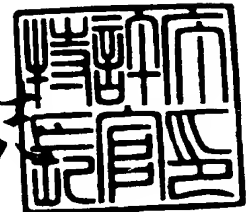
**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 3月 5日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

伴佐山建志



出証番号 出証特平11-3011032

【書類名】 特許願

【整理番号】 PA905706

【提出日】 平成10年 1月30日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 A61K

【発明の名称】 M161Agからなるサイトカイン誘発剤

【請求項の数】 6

【発明者】

    【住所又は居所】 奈良県奈良市鶴舞西2-10、E-106

    【氏名】 瀬谷 司

【発明者】

    【住所又は居所】 奈良県生駒市北大和2-20-7

    【氏名】 松本 美佐子

【特許出願人】

    【識別番号】 396020800

    【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

    【代表者】 理事長 中村 守孝

【代理人】

    【識別番号】 100102668

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 佐伯 憲生

    【電話番号】 03-5688-5136

【手数料の表示】

    【納付方法】 予納

    【予納台帳番号】 039251

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

特平 1 0 - 0 3 2 3 8 4

【物件名】            要約書    1

【物件名】            委任状    1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 M161Ag からなる サイトカイン誘発剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 蛋白質 M161Ag 又はその遺伝子組換え産物を含有してなる サイトカイン誘発剤。

【請求項 2】 誘導される サイトカイン類が、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、IL-12 及び／又は INF- $\gamma$  である請求項 1 に記載の サイトカイン誘発剤。

【請求項 3】 サイトカイン誘発剤が免疫調節剤として使用される請求項 1 又は 2 に記載の サイトカイン誘発剤。

【請求項 4】 免疫調節剤が免疫関連疾患の治療剤として使用される請求項 3 に記載の サイトカイン誘発剤。

【請求項 5】 蛋白質 M161Ag 又はその遺伝子組換え産物が、その N 末端が脂肪酸でアシル化されたものである請求項 1～4 のいずれか一項に記載の サイトカイン誘発剤。

【請求項 6】 蛋白質 M161Ag 又はその遺伝子組換え産物を含有してなる免疫疾患治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する分野】

本発明は、蛋白質 M161Ag を含有してなる サイトカイン誘発剤 (Cytokine Inducer)、免疫調整剤、免疫療法剤に関する。

【0002】

【従来技術】

M161Ag は、ヒト骨髄性白血病細胞株 P39 (+) などのマイコプラズマファーマンタンス (Mycoplasma fermentans) の潜伏感染細胞に含まれる膜タンパク質であり、第 2 補体活性化経路の活性化や補体 C3 の吸着などの機能を有する。このタンパク質の単離精製、及びモノクローナル抗体の作製はすでに報告されている (Matsumoto et. al., J. Exp. Med. 181

， 115-125 (1995) )。また大部分の一次構造も報告されている (Nature Med. , 3:1266-1270 (1997) ) (特開平9-157295号)。

【0003】

マイコプラズマファーマンタンス (M.fermentans) はH I V感染患者、白血病や骨髓腫などのがん患者、再生不良性貧血患者など免疫能が低下する病態下で陽性になる細胞内寄生細菌である。主な寄生宿主は、インビトロ (in vitro) でヒト腫瘍細胞株と同定されている。マイコプラズマファーマンタンス (M.fermentans) 陽性例ではM161Agも必ず陽性になることが知られている。

また、マイコプラズマ (Mycoplasma) は別のグループの報告では、リンパ球低下の一因とされ、A I D S発症のコファクターとされてきた。また、マイコプラズマファーマンタンス (M.fermentans) はインビトロ (in vitro) で白血球系を刺激してサイトカインを誘導することが示唆されてきた。これらの現象は他のマイコプラズマ種では起きず、ファーマンタンスのみに見られることから、マイコプラズマファーマンタンス (M.fermentans) に特有な遺伝子産物のあるものがリンパ球低下、サイトカイン誘導を指令すると考えられてきた。しかし、いかなる物質がその活性に責任をもつか不明であった。本発見者はマイコプラズマファーマンタンス (M.fermentans) のこれら生物活性を司る物質を精製標品を用いたアッセイで同定、その生物活性の範囲を明確化し、本発明を完成した。

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、M161Agの生理活性・サイトカイン誘導活性を用いて、M161Agからなるサイトカイン誘発剤、免疫調整剤及び免疫療法剤を提供し、各種免疫関連疾患の治療に役立てることにある。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、M161Agの精製標品を用いて、単球、リンパ球などの免疫担当細胞を刺激し、I L-1 $\beta$ 、T N F- $\alpha$ 、I L-6などの炎症サイトカイン、I L-10、I L-12のリンパ球活性化サイトカインを効果的に誘導し、また、感染細胞をアポトーシス化で排除することに成功し、本発明を完成した。

本発明は、蛋白質M161Ag又はその遺伝子組換え産物を含有しているサイトカイン誘発剤 (Cytokine Inducer)、免疫調整剤又は免疫関連疾患の治療剤に関する。

## 【0005】

本発明のM161AgのDNAは、マイコプラズマファーマンタンス (M.fermentans) を感染・増殖させたヒト骨髓性白血病細胞株P39、ヒト線維芽細胞株W138などからゲノムDNA (genome) として得られる。これらのDNAはTGA (大腸菌、ヒトにおいては終止コドン、マイコプラズマではトリプトファン) を5つ含むので、これらをTGGに置き換えてpPLH3などヒスタグ (His-tag) のついた大腸菌の発現ベクターに組み込み、菌内で強制発現させる。こうして得られた大量の遺伝子組換え産物をニッケル・セファロースカラムとMK53 (抗M161Ag抗体) セファロースカラムで精製する。本標品は大腸菌由来のパイロジェンフリーを確認してある。

## 【0006】

こうして精製されたM161Agは分子量45kDaでN末システインにパルミチン酸などの脂質が結合している。M161Agを細胞と混合すると、この脂質を介して一部が細胞に取り込まれる。インビトロで末梢血、単球、単球系の細胞株にM161Agを混合すると、24時間以内に培養上清にIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、などマクロファージ由来の炎症性サイトカイン、IL-10、IL-12など、リンパ球のモジュレーター活性をもつサイトカインが同定される。活性をリポポリサッカライド (lipopolysaccharide (LPS)) と比較すると、同一重量 (例えば10ng) を用いた場合、上記全てのサイトカインはLPSよりM161Agでより強力に誘導される。なお、本実験に用いた単球はエルトリエーションシステム (elutriation system (Beckman)) を用いたカルプ (Karp) らの方法によるもので95%以上の精製度である。従って、これらのサイトカインはM161Agが単球を直接刺激して誘導されたと結論しうる。

## 【0007】

M161Agが、マイコプラズマ由来でヒトサイトカインを強力に誘導する生理活性物質であることが証明でき、かつ、この作用を通して、ヒト基本免疫系 (

innate immunity) を活性化し、免疫低下時の宿主免疫を改善すること、さらにリンパ球など感染細胞をアポトーシス死に陥らしめ、アレルギー等の過度の免疫活性化の病態を押さえることが判明した。

以上から M161Ag は単球系を介して多彩な免疫系のモジュレーターとしてのサイトカインを誘導することが証明された。

【0008】

本発明の蛋白質 M161Ag で誘発されるサイトカインは種々の生理活性を有することが知られている。例えば、IL-1 は、T 細胞活性化、好中球活性化、抗腫瘍活性の亢進、線維芽細胞増殖、ACTH・GH などの分泌増加などの作用が知られている。TNF- $\alpha$  は細胞の増殖、分化に参与する因子であり、特に腫瘍壊死作用を有する因子である。また、プロスタグランジンや血小板活性化因子の産生を増強し、さらには抗ウイルス作用を有するとの報告もされている。

【0009】

IL-6 は、B 細胞の抗体産生細胞への分化を促進させ、T 細胞やマイクロファージの分化・増殖を促進させる作用を有する。IL-10 は T 細胞を増殖させ、IL-12 は細胞障害性 T リンパ球 (CTL) や NK 細胞を活性化する作用を有する因子である。

M161Ag はサイトカイン誘発活性を種々の免疫関連疾患、がんなどの治療に適用できる。

本発明の有効成分は、ヒト基本免疫系を活性化するものであるから、基本免疫系が関与する各種の免疫関連疾患の治療剤として有用である。免疫疾患としては、例えば、アレルギー疾患、自己免疫疾患などが挙げられる。

【0010】

本発明の蛋白質 M161Ag は、細胞株 P39 (+) などの細胞からの抽出物を使用することもできるが、例えば、特開平 9-157295 号などに開示されている DNA を用いて、各種の宿主細胞を用いてこれを発現させたもの (遺伝子組換え産物) を用いてもよい。

本発明の蛋白質 M161Ag は、その活性を維持できる範囲で、1 個以上のアミノ酸が缺失してもよいし、1 個以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換して

もよいし、1個以上のアミノ酸が付加していてもよい。

また、本発明のM161Agは、蛋白質のままでも使用することもできるが、N末端やアミノ酸鎖の適当な位置を脂肪酸などで修飾したものや、癌細胞など細胞に特異的な抗体と結合などの修飾をして使用することもできる。

#### 【0011】

本発明の有効成分となる蛋白質M161Agの投与量は、患者の状態や疾病の種類によっても異なるが、通常は1日当り、0.01~100ng/kg、好ましくは0.1~10ng/kgであり、通常は1日1~3回投与される。

投与方法としては、静脈注射、皮下注射などが好ましいが、舌下錠や直腸投与などの非経口投与であれば特に制限はない。

#### 【0012】

投与形態としては、通常の蛋白質の製剤化法により製剤化されたものを使用できる。また、リポソーム製剤などの乳化剤として使用することもできる。

#### 【0013】

##### 【実施例】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

##### 実施例1

単球系細胞株THP-1 ( $10^6$ ) に6ng、12ngのM161Agを加えた。24時間後に培養上清を回収し、各種サイトカインをサンドイッチELISA法で定量した。LPSとの比較データも併せて図1に示す。

#### 【0014】

##### 実施例2

精製末梢血単球 ( $10^6$ ) に2.4ng、12ngのM161Agを加えた。24時間後に培養上清を回収し、各種サイトカインをサンドイッチELISA法で定量した。LPSとの比較データも併せて図2に示す。

#### 【0015】

##### 実施例3

精製末梢血単球 ( $10^6$ ) に2.4ng/ml、12ng/mlのM161A



g を加えた。24 時間後に培養上清の IL-10、IL-12 を定量した。結果を図 3 に示す。

【0016】

【発明の効果】

本発明はマイコプラズマファーマンタンスの膜蛋白質、M161Ag の新規な生理活性に基づく薬剤を提供する。M161Ag は強力なサイトカイン誘発活性を示し、アレルギー時、免疫低下時などの免疫調節薬として利用できる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、単球系細胞株 THP-1 による、本発明の蛋白質 M161Ag の IL-1 $\beta$ 、INF- $\alpha$  及び IL-6 の誘発作用を示すものである。

図 1 の左側は細胞溶解物からのデータであり、右側は条件培地でのデータである。

【図 2】

図 2 は、精製末梢血単球による、本発明の蛋白質 M161Ag の IL-1 $\beta$ 、INF- $\alpha$  及び IL-6 の誘発作用を示すものである。

図 2 の左側は細胞溶解物からのデータであり、右側は条件培地でのデータである。

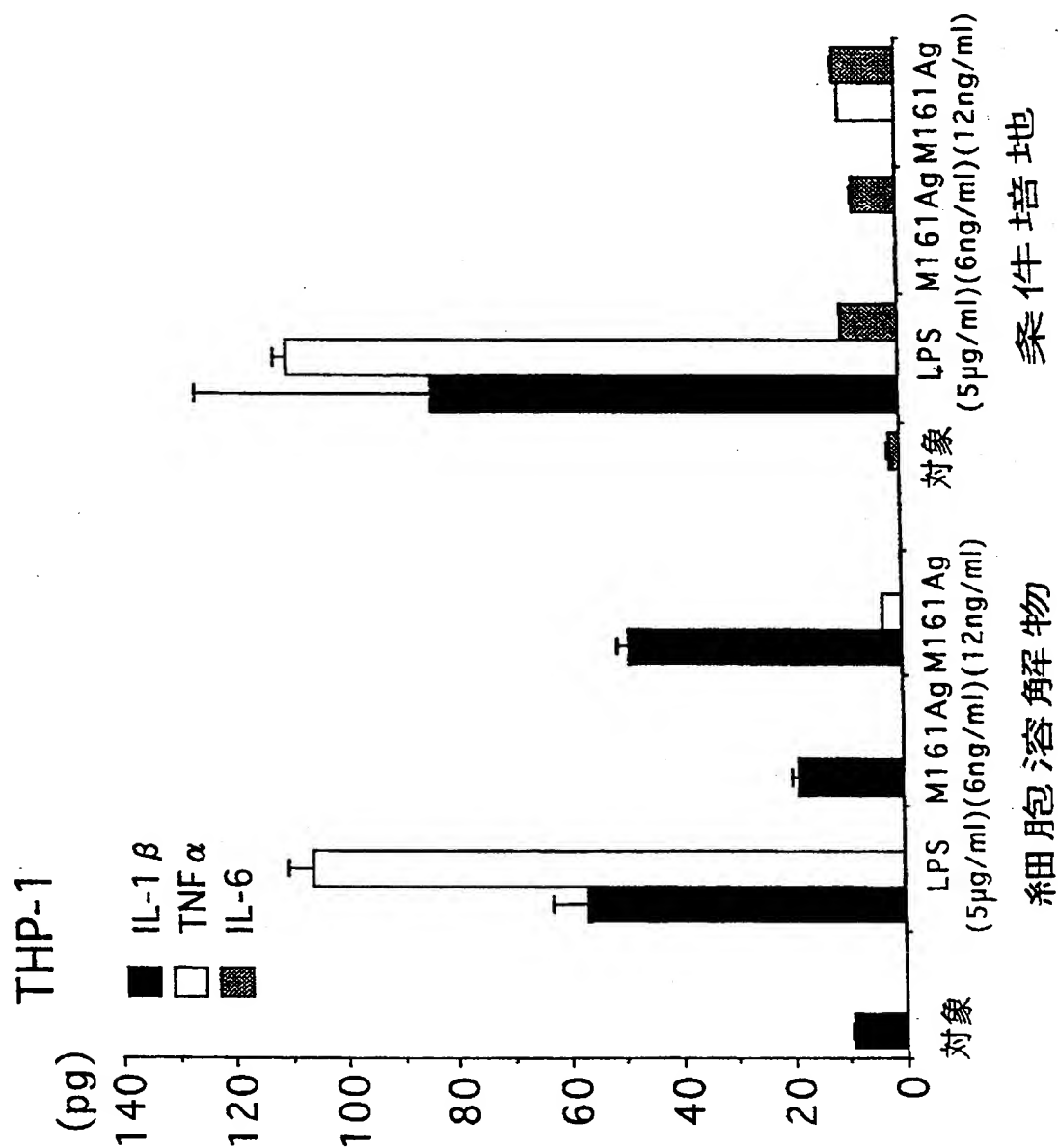
【図 3】

図 3 は、精製末梢血単球による、本発明の蛋白質 M161Ag の IL-10 (図 3 左側) 及び IL-12 (図 3 右側) の誘発作用を示すものである。

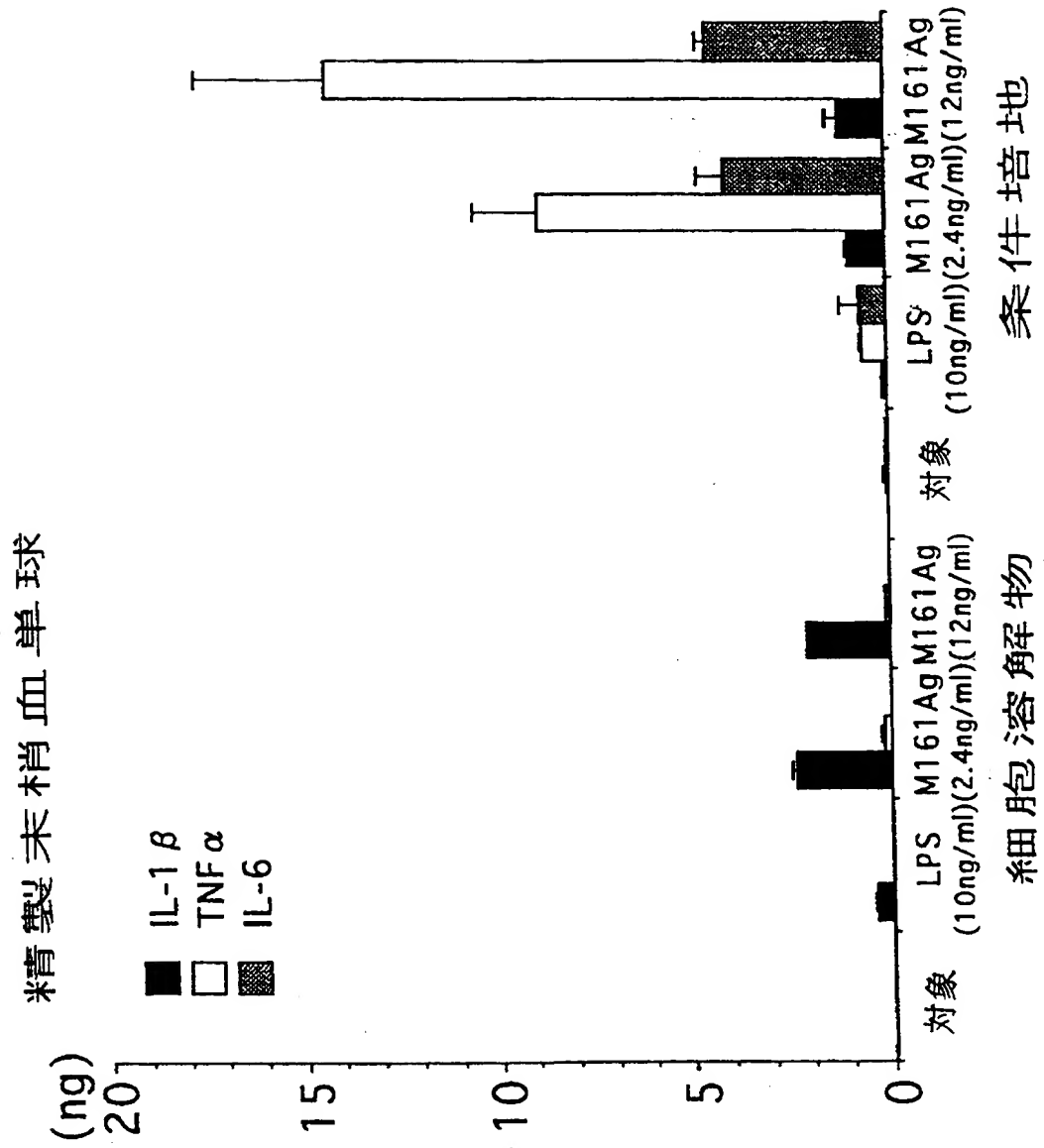
【書類名】

図面

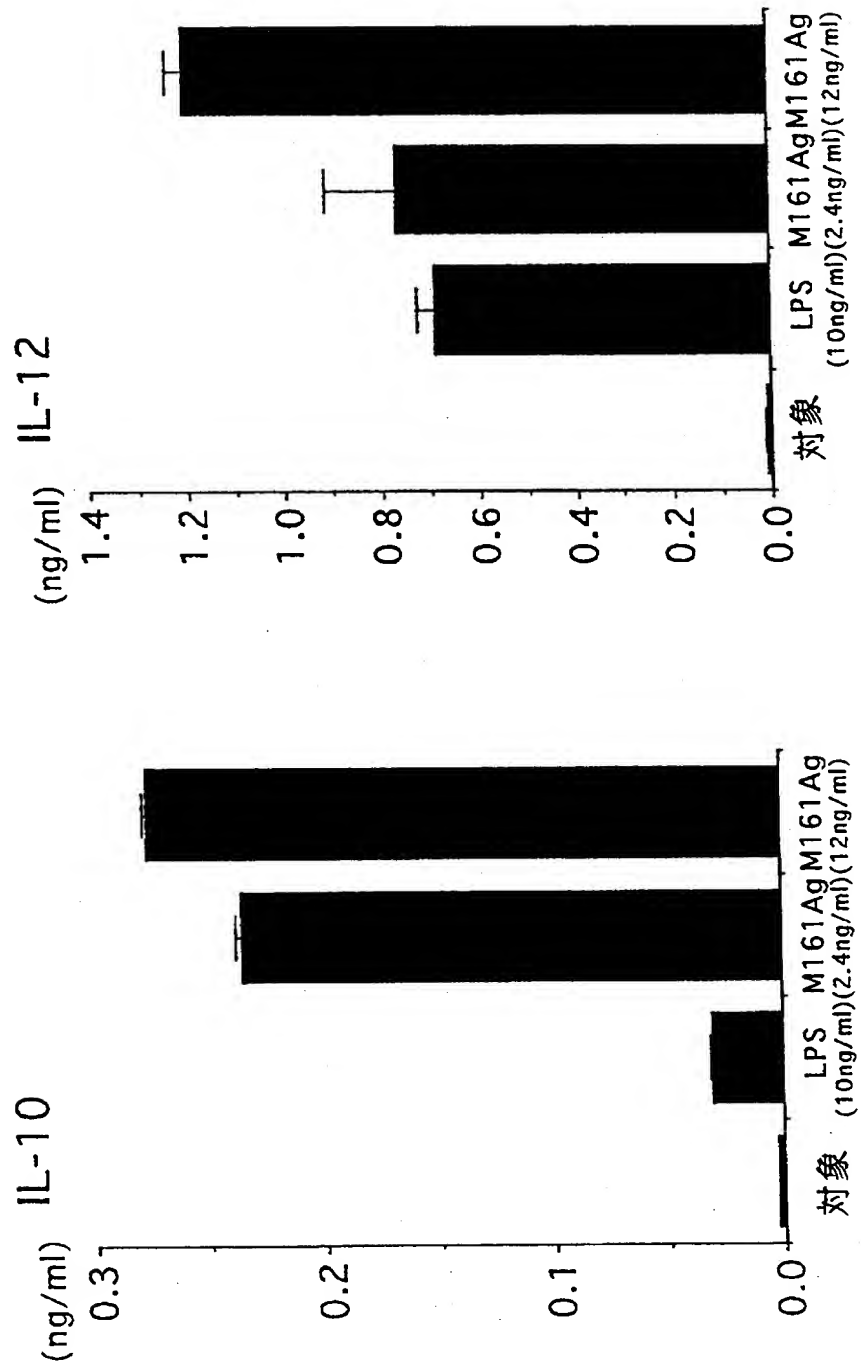
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

1 / 1

【要約】

【課題】 蛋白質M161Agからなるサイトカイン誘発剤を提供する。

【解決手段】 本発明は、蛋白質M161Ag又はその遺伝子組換え産物からなるサイトカイン誘発剤に関し、免疫調節剤や各種免疫関連疾患の治療剤として有用である。

【選択図】 なし

## 委任状

平成10年 / 月 / 6日

私儀 識別番号100102668 弁理士 佐伯 憲生 氏  
を代理人として次の事項を委任します。

- 1、 「M161 Ag からなるサイトカイン誘発剤」  
特許出願に関する一切の件並びに本件に関する放棄若しくは取下げ、出願変更及び拒絶査定に対する審判の請求並びにその取下げ。
- 2、 上記出願に基づく特許法第41条第1項及び実用新案法第8条第1項の優先権主張並びにその取下げ及び優先権主張に伴う後の出願に関する一切の件。
- 3、 上記出願の分割出願に関する上記事項一切。
- 4、 上記出願に関する審査請求、優先審査に関する事情説明書の提出、刊行物の提出、証明の請求及び上記出願又は審判請求に関する物件の下附を受ける事項。
- 5、 第1項に関する通常実施権許諾の裁定請求、裁定取消請求並びにそれ等に対する答弁、取下げその他本件に関する提出書類及び物件の下附を受ける事項。
- 6、 上記出願に係る特許権に関する一切の手続。ただし、特許権の維持に係る年金納付に関する手続を除く。
- 7、 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続に関する事項。
- 8、 上記事項を処理するため、復代理人を選任及び解任する事項。

識別番号 396020800  
埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
科学技術振興事業団  
理事長 中村 守孝



【書類名】 職権訂正データ  
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】  
【識別番号】 396020800  
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町4丁目1番8号  
【氏名又は名称】 科学技術振興事業団  
【代理人】 申請人  
【識別番号】 100102668  
【住所又は居所】 東京都台東区台東1丁目30番9号 第二ツチャピ  
ル 9階 たくみ特許事務所  
【氏名又は名称】 佐伯 憲生  
【提出された物件の記事】  
【提出物件名】 委任状（代理権を証明する書面） 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [396020800]

- |          |                 |
|----------|-----------------|
| 1. 変更年月日 | 1996年 9月18日     |
| [変更理由]   | 新規登録            |
| 住 所      | 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 |
| 氏 名      | 科学技術振興事業団       |
|          |                 |
| 2. 変更年月日 | 1998年 2月24日     |
| [変更理由]   | 名称変更            |
| 住 所      | 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 |
| 氏 名      | 科学技術振興事業団       |